

A pályázat végrehajtása során elért eredményeket az alábbi csoportosítás szerint tárgyaljuk:

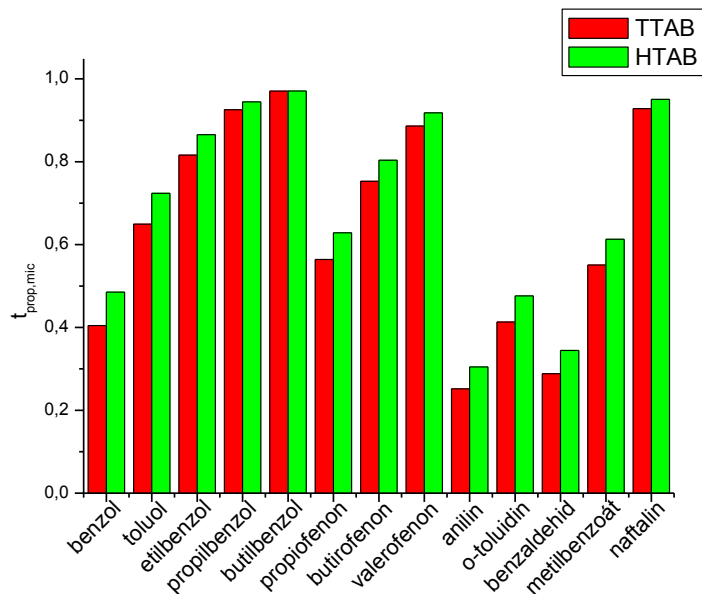
1. *Különböző elválasztás-technikai módszerek fejlesztése és karakterizálása*
 - 1.1 - MEKC : elválasztást befolyásoló paraméterek vizsgálata
 - 1.2 - CE : elválasztást befolyásoló paraméterek vizsgálata
 - 1.3 - HPLC:hidrofóbitás vizsgálata IAM és RP-HPLC oszlopokon
2. *Elválasztás-technikai módszerek alkalmazása különböző típusú molekulakönyvtárak jellemzésére: modell vegyületek hidrofóbitásának kísérleti és számítógépes úton történő meghatározása*
 - 2.1 - benzilidén cikloalkanon származékok
 - 2.2 – izokromanonok
3. *Molekulakönyvtárak fizikiai-kémiai és biológiai karakterizálása*
 - 3.1 - peptidomimetikumok (tumor és neurogén gyulladásgátlók, retenciós idők – hidrofóbitás)
 - 3.2 - angiogenezisre ható peptidek (stabilitás vizsgálata HPLC-vel, kapszulázáshoz)
 - 3.3 - ionos folyadékok

1. Különböző elválasztás-technikai módszerek fejlesztése és karakterizálása

1.1. MEKC : elválasztást befolyásoló paraméterek vizsgálata

A micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC) segítségével módszert fejlesztettünk ki különböző vegyületcsoportok hidrofóbitásának meghatározására. A vizsgált vegyületek CLOGP értékeit összehasonlítva a kutatócsoport által korábban bevezetett micelláris fázisra vonatkozó fázistartózkodási idő (t_{mic}) valamint az újonnan bevezetett normalizált fázistartózkodási idővel ($t_{prop,mic}=t_{mic}/t_m$), lineáris korrelációt találtunk a vizsgált értékek között, amely lehetővé teszi a vegyületek hidrofóbitás értékeinek a meghatározását.

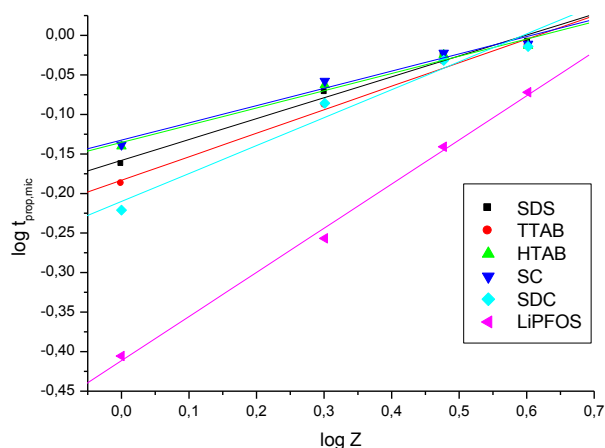
A $t_{prop,mic}$ paraméter segítségével nem csak a hidrofóbitás, de a pszeudostacioner (PS) fázis és a minta közötti kölcsönhatás is jellemezhetővé vált. A fázistartózkodási idők gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata során bizonyítottuk, hogy a micelláris fázistartózkodási idő (t_{mic}), mint kísérletileg meghatározható paraméter alkalmazásával jellemezni, illetve összehasonlítani tudjuk a micelláris elektrokinetikai kromatográfiában alkalmazott különböző kémiai jellegű pszeudo-stacioner fázisok hidrofóbitását. Az elemzést a leggyakrabban alkalmazott NaDS megosztófázison túl más kationos és anionos PS fázisokra is kiterjesztettük, melynek alapján a következő sorrendet állítottuk fel a vizsgált PS fázisok hidrofóbitása között: SDS>HTAB>TTAB>SC>LiPFOS>SDC (nátrium-dodecilszulfát > hexadecil-trimetilammónium-bromid > tetradecil-trimetilammónium-bromid > nátrium-kolát > lithium-perfluorooctanesulphonate > nátrium-deoxocolát). Az 1. ábra szemlélteti a különböző tesztvegyületek normalizált fázistartózkodási idejét két különböző PS fázison (HTAB és TTAB). Jól látható hogy minden esetben a $t_{prop,mic}$ érték nagyobb a HTAB fázis, mint TTAB fázis esetén, ami azt jelenti, hogy a HTAB, amely két metilén-csoporttal hosszabb láncsal rendelkezik, mint a TTAB, erősebb kölcsönhatásba lép a teszt vegyületekkel.



1. ábra

A normalizált fázistartózkodási idő összehasonlítása TTAB és HTAB állófázis esetében

A normalizált fázistartózkodási idő segítségével meghatároztuk a kísérletek során alkalmazott pszeudofázisok metilénszelektivitását is. A számításokhoz a Martin egyenletet ($\log t_{\text{prop,mic}} = A \cdot \lg Z + B$; ahol Z az alkil lánc szénatomszáma, A az illesztett egyenes meredeksége, amely egyben a metilén szelektivitást jellemzi) és egy alkil benzol homológ sor migrációs adatait használtuk fel. A vizsgált PS fázisok között, metilénszelektivitás alapján, az alábbi sorrendet állítottuk fel: LiPFOS > SDC > TTAB > SDS > SC > HTAB (2. ábra). A LiPFOS bizonyult a leginkább metilénszelektív PS fázisnak, míg a HTAB a legkevésbé szelektívnek. Ezen adatok ismerete megkönnyíti egy adott kísérlet megtervezése során az elválasztáshoz legalkalmasabb PS fázis kiválasztását.



2. ábra

A log Z vs. log t_{prop,mic} ábra, a különböző fázisok metilénszelektivitásának meghatározásához

Elvégeztük a micelláris fázistartózkodási idő alkalmazását kevert PS fázisok jellemzésére, összehasonlítására is. A micelláris elektrokinetikus kromatográfiában (MEKC)

alkalmazott detergenszekből, lítium-dodecil-szulfátból (LDS) és lítium-perfluoro-oktán-szulfonátból (LiPFOS) kevert pszeudo-állófázisok lipofilicitását és metilén-szelektivitását vizsgáltuk. Ezen vegyes összetételű micella-fázisok visszatartási képességét különböző vegyületcsoportokba (alkil-benzolok, alkil-fenolok és alkoholok) tartozó minták segítségével határoztuk meg. A vizsgált retenciós paraméterek és a kevert pszeudo-állófázisok összetétele között lineáris összefüggés mutatkozott, így a tiszta detergenszek megfelelő arányú elegyítésével tetszőlegesen változtatható a vegyes összetételű micella-fázisok lipofilicitása és metilén-szelektivitása

1.2. CE: Elválasztást befolyásoló paraméterek vizsgálata

Folytattuk a kapilláris elektroforézisben az elválasztást befolyásoló paraméterek vizsgálatát, különös tekintettel a falon történő adszorpció befolyásolására. A kapilláris falának különböző polimerekkel történő bevonása módosíthatja a mintakomponensek falon történő adszorpcióját, befolyásolva ezzel az elválasztási folyamatot. Ennek különösen nagy jelentősége lehet biológiailag aktív molekulák, polipeptidek, fehérjék analízisének.

Az ELTE Kémiai Intézetével együttműködve, fizikai határfelületi vizsgálati módszerek alkalmazásával vizsgáltuk különböző polimerek adszorpció, bevonatképző tulajdonságait, vizsgáltuk a polimereknek hidofil/hidrofób határfelületen mutatott viselkedését. E munkát kiterjesztettük poli-tejsav [PLA]/ poli(eilénnoxod)-poli(propilénnoxid)-poli(etilénnoxid) [Pluronic] alapú kevert bevonatok tulajdonságainak vizsgálatára. A bevonatok biokompatibilitását, a biokompatibilitás növelésének lehetőségét, valamint lipid réteg és hatóanyagok (analizálandó molekulák) kölcsönhatását vizsgáltuk. A Langmuir-mérleg technika rendkívül jól alkalmazható módszernek bizonyult a falbevonat és az oldatfázisban lévő molekulák kölcsönhatásának vizsgálatában. Megállapítottuk, hogy a falbevonat PLA/Pluronic összetételének változtatásával a fal adszorpció tulajdonságai változtathatók, és megfelelő összetételű bevonat alkalmazásával a nem kívánatos adszorpció (pl. fehérje adszorpció) csökkenthető

1.3 HPLC: Hidrofóbitás vizsgálata IAM és RP-HPLC oszlopokon

Újonnan előállított molekulakönyvtárak tagjainak lipofilitását jellemeztük konvencionális fordított fázisú oszlopokról (RP HPLC) ill. un. membrán-mimikáló (immobilized artificial membrane) IAM HPLC oszlopról történő elúciójuk alapján. Az így nyert retenciós adatokkal jellemeztük a vizsgált molekulák hidrofóbitását, ill. a molekulák és az IAM oszlop közötti kölcsönhatást, és ezzel a várható membrán kölcsönhatásokat. A konvencionális, alkil-láncokat tartalmazó RP oszlopok az analizálandó mintát pusztán a hidrofób kölcsönhatások alapján választják el, míg az IAM oszlopok esetében a kölcsönhatásokban szerepet játszanak hidrofób, ionos és hidrogénhidas kölcsönhatások is, hasonlóan a valóságos biológiai membránokhoz.

Kísérleteinkben hagyományos C8 (MOS) RP HPLC oszlopot és IAM-PC oszlopot használtunk. Ez utóbbiban az IAM fázist foszfatidilkolin monolayer képviseli. Hasonló kémiai szerkezettel rendelkező, 38 auron és tioauron származék elválasztása és lipofilitásának karakterizálása történt meg mindkét oszlopon. A kísérletileg meghatározott lipofilitási adatokat (k'_{MOS} és k'_{IAM}) összehasonlítottuk a számított lipofilitási paramétereikkel (CLOGP). A kísérletileg meghatározott és számított lipofilitási adatok mind a MOS mind az IAM oszlop esetében jó korrelációt mutattak. Ezen belül az IAM oszlop hatékonyabb volt az izomer auron-tioauron vegyületek elválasztásában, így lipofilitásuk megkülönböztetésében is. Ezek az adatok is azt bizonyítják, hogy az alkalmasan megválasztott HPLC technika, mint gyors és

egyszerű módszer, nagy segítség a szerkezetileg hasonló gyógyszerjelölt molekulák lipofilitásának jellemzésében.

2. Elválasztás-technikai módszerek alkalmazása különböző típusú molekulakönyvtárak jellemzésére (modell vegyületek hidrofóbitásának kísérleti és számítógépes úton történő meghatározása)

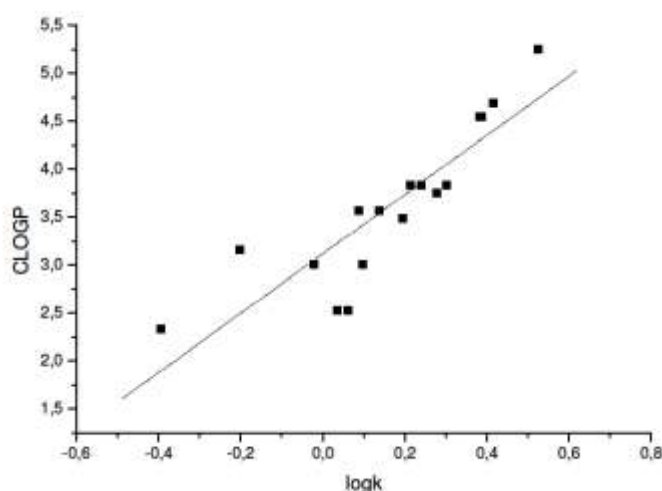
A kutatás során, a Pécsi Egyetem kutatóival együttműködésben, elvégeztük különböző molekulakönyvtárak szintézisét, és tagjainak gyógyszerre fejlesztés szempontjából fontos karakterizálását. A hatékony elválasztás-technikai módszer egyszerre tud adatot szolgáltatni a vegyület tisztaságáról és olyan fizikai-kémiai tulajdonságairól, amelyek a gyógyszerre fejlesztés szempontjából fontosak, mint pl. hidrofóbitás, membránnal való kölcsönhatások (lásd. 1.3 fejezet), fajlagos töltések stb. Gyors és hatékony HPLC rendszereket fejlesztettünk ki benzylidén cikloalkanon származékokból, izokromanonokból, és hydroxiquinolin származékokból felépülő könyvtárak tagjainak elválasztására és jellemzésére.

2.1 - benzylidén cikloalkanon származékok

A benzylidén cikloalkanon származékok 24 tagú „könyvtár” képviselnek, amelynek szintézisét és karakterizálását végeztük el. Szerkezetük alapján a könyvtár tagjai két fő csoportot alkotnak, az egyiket szubsztituált arylmethylen-cyclopentanonok a másikat szubsztituált arylmethylen-cyclohexanonok alkotják. Az egyes csoportokban a tagok az alkalmazott szubsztituensekben tértek el egymástól, amelyek úgy lettek megválasztva, hogy elektron-küldő, ill. elektron-szívó tulajdonságaik hatását tanulmányozni lehessen. A kifejlesztett izokratikus RP-HPLC módszer gyorsan és hatékonyan választotta el a különböző szubsztituált cikloalkanonokat. Lipofilitásukat mind kísérletileg (*k*) mid komputeres predikcióval (CLOGP) meghatároztuk és jó korrelációt mutató lineáris összefüggést kaptunk. A vegyületek sejtnövekedést gátló hatását A431 humán epidermoid tumor-sejteken vizsgálva néhány esetben igen alacsony (13 - 6.6 μM) IC_{50} értékeket kaptunk. A ciklohexanonok általában aktívabbak voltak, mint a ciklopentanonok, és elektron-szívó szubsztituensek előnyösen növelték ezt a hatást. Az RP-HPLC metodika, ellentétben a számítási módszerrel, képes volt megkülönböztetni az orto- és para-izomereket, kihasználva a lipofilitásukban és biológiai aktivitásukban mutatkozó különbséget. Az ily módon kísérletileg meghatározott fiziko-kémiai paraméterek (*k*, log *k*) megbízható és hasznos adatokat szolgáltatnak különböző könyvtárak tagjainak elő-tesztelésére, valamint biológiai hatékonyság szempontjából fontos szerkezeti elemek becslésére.

2.2 - izokromanonok

A cikloalkanonoknál bemutatott kísérletsorozathoz hasonlóan egy 19 tagú izokromanon könyvtár vizsgálatát is elvégeztük. A könyvtár tagjainak szintézisekor, a Knoevenagel kondenzációs reakció aldehid komponensétől függően, sok esetben az E és Z izomerek keveréke keletkezik. Így a könyvtár tagjainak kromatográfiás elválasztást és jellemzését megnehezítette az izomerek jelenléte. Ebben az esetben is sikerült egy olyan RP-HPLC eljárást kidolgozni, amelyben nem csak a különböző szubsztituenseket tartalmazó tagokat, de az azonos szubsztituenseket o-, m-, vagy p-, helyzetben tartalmazó vegyületeket, valamint az E és Z izomereket is sikerült elválasztani. Összehasonlítva a kromatográfiás paramétereket (log*k'*) és a computer által számított adatokat (CLOGP), ebben a sorozatban is jó korrelációt mutató lineáris összefüggést kaptunk (3. ábra).



3. ábra.

Összefüggés az izokromanon könyvtár tagjainak számított (CLOGP) vs. mért (logk) lipofilitási értékei között.

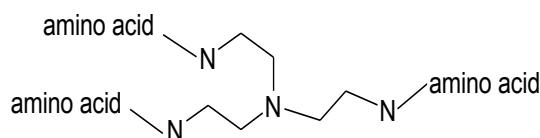
A biológiai vizsgálatok különbséget mutattak az E és Z izomerek aktivitásában, az E izomerek bizonyultak aktívnak a tumoros sejtnövekedés gátlásában. A morfológiai képek azt mutatták, hogy a gátló hatást apoptózis indukálása útján váltja ki az aktív vegyület ezt a hatást FACS analízis vizsgálatokkal is igazoltuk.

Összefoglalva a molekulakönyvtárak lipofilitásával kapcsolatos kísérleti eredményeket: Optimális HPLC analízist dolgoztunk ki a lipofilitás jellemzésére, amelyet a biológiai hatékonyság jellemzésére sejtes assay-vel kombináltunk. Az így nyert adatok segítségével meghatároztuk az adott könyvtárra jellemző optimális lipofilitási tartományt, amelyet új, antiproliferatív hatású vegyületek tervezésében lehet hasznosítani.

3. Molekulakönyvtárak fizikiai-kémiai és biológiai karakterizálása

3.1 - peptidomimetikumok

Elvégeztük a klinika II vizsgálatokon túljutott antitumor és neurogén gyulladásgátló hatású, a kutatócsoport által kifejlesztett, TT232 molekula követő molekuláinak a szintézisét és ennek a kombinációs molekulakönyvtárnak a fizikai-kémiai, valamint biológiai karakterizálását. A vegyületek egy egyszerű, flexibilis mag (triszamino-etilamin: TAEA) körül elrendezve tartalmazzák a biológiai hatás szempontjából fontos funkciós csoportokat (aromás, heteroaromás, bázikus) különböző aminosavak oldalláncaiban (4. ábra).



4. ábra: TAEA- származékok általános képlete

A vegyületeket fizikai kémiai és RP-HPLC-s adatokkal jellemeztük, valamint biológiai vizsgálatukat is elvégeztük, mind proliferáció-, mind neurogén gyulladás gátlására. Megállapítottuk, hogy a kívánt biológiai hatás eléréséhez nem szükséges mind a három funkciós csoport (aromás, heteroaromás, bázikus) egyidejű jelenléte a molekulában, igen erős neurogén gyulladásgátló hatás érhető el, mindössze két csoport jelenléte esetében is (heteroaromás-aromás, ill. aromás-bázikus). Az egyik vegyülettel, melynek angiogenezist moduláló hatása van, spanyol kutatókkal együttműködésben, micro- és nano-kapszulák készítése és jellemzése is megtörtént. Analitikai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a hatóanyag felszabadulása aktív és kontrollált (néhány naptól, több mint egy hónapig) formában történik.

3.2 - Dipeptidamidok

A TT-232 ciklikus heptapeptid követő molekuláinak szintézise során, japán kutatókkal együttműködve, a heptapeptid szerkezetét sikerült olyan kis lineáris dipeptidamidokra egyszerűsíteni, amelyek megőrizték, a kiindulási molekula erős tumor- és neurogéngyulladás-gátló hatását. A biológiailag aktív molekularészletet a –Tyr-D-Trp- szekvencia részlet képviseli, amelynek N- és C-terminális részét különböző szubsztitúciókkal variáltuk. A vegyületek RP-HPLC karakterizálása és biológiai aktivitása alapján megállapítottuk, hogy a nagy, hidrofób szubsztitúciók mind az N- mind a C-terminálison növelik a biológiai hatékonyságot, de ezen túlmenően az alifás tulajdonság és a molekula rigiditása is fontos tényezők.

Összefoglalva: Az új vegyületek mind a két típusában volt olyan molekula, amely *in vitro* a P anyag felszabadulását jelentősen (90-100 %) gátolta. A leghatékonyabb vegyületek *in vivo* i.p. adagolás mellett 50-55 %-ban gátolták az akut neurogén gyulladást, és p.o adagolva is 30 %-os gátlást mutattak. Az előállított molekulák között orálisan ható vegyületek is vannak, melyek lehetőséget nyújtanak a TT232 követő molekuláiként egy új gyógyszer kifejlesztésére.

3.3 - ionos folyadékok

23 hydroxiquinolin alapú, ún. „ionos folyadék” szintézisét oldottuk meg, a Queen's University of Belfast-al együttműködésben, abból a célból, hogy a kiindulási vegyületek vízdékonyságát növeljük. A hydroxiquinolinok széleskörű biológiai hatással rendelkező (pl. malária ellenes szerek, tumorgátlók) vegyületcsoportot alkotnak, azonban gyenge vízdékonyságuk miatt bio-transzportjuk nehezen megoldható. Biológiailag aktív, vízdíszható sóvá történő alakításuk nagy jelentőséggel bírna a gyógyszertranszport szempontjából. Só-képzésüket oldatban (kámforszulfonsav és kénsav segítségével) és por-formában (kámforszulfonsav segítségével) is elvégeztük, az így kapott vegyületeket különböző analitikai vizsgálatokkal (NMR, MS-ES, X-ray diffrakció) jellemeztük. A kiindulási hydroxiquinolin származékok vízdékonyságát megnövelte ionos folyadékká történő átalakításuk és néhány esetben A431 sejtvonalon mért sejtnövekedést gátló hatásuk is jelentősebb volt.